



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
LABORATÓRIO DE NEUROBIOLOGIA E HEMATOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

ANÁLISE DOS EFEITOS DO EGF E DO FGF2 SOBRE A
DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRUNCAL DE
CODORNAS, *IN VITRO*

BIANCA LUISE TEIXEIRA

FLORIANÓPOLIS

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISE DOS EFEITOS DO EGF E DO FGF2 SOBRE A
DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRUNCAL DE
CODORNAS, *IN VITRO*.

Trabalho de Conclusão do Curso

(Estágio II – BIO 5156)

ACADÊMICA: Bianca Luise Teixeira
Ciências Biológicas, 9ª fase

ORIENTADOR: Prof.^a Dr.^a Andréa Gonçalves Trentin
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética
Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular e Molecular

CO-ORIENTADOR: Dr. Ricardo Castilho Garcez
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética
Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular e Molecular

Florianópolis, Junho de 2009.

Assinatura do(a) Acadêmico(a)

Assinatura do(a) Orientador(a)

ANÁLISE DOS EFEITOS DO EGF E DO FGF2 SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DAS
CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRUNCAL DE CODORNAS, *IN VITRO*

BIANCA LUISE TEIXEIRA

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado como pré-requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Banca Examinadora

Prof. ^a Dr.^a Andréa Gonçalves Trentin (Presidente)
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – UFSC

Prof. Dr. Giordano Wosgrau Calloni (Membro Titular)
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – UFSC

Prof. ^a Ms. Evelise Maria Nazari (Membro Titular)
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – UFSC

Ezequiel Peyerl (Membro Suplente)
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – UFSC

Florianópolis, 30 de Junho de 2009.

"O único homem que nunca comete erros é aquele que nunca faz coisa alguma. Não tenha medo de errar, pois você aprenderá a não cometer duas vezes o mesmo erro".

Roosevelt

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dr.^a Andréa Gonçalves Trentin, pela confiança em meu trabalho, por todo apoio e incentivo constante, por ser uma referência de profissionalismo.

Ao recém Dr. Ricardo Castilho Garcez, meu querido co-orientador, que foi meu grande professor durante a Iniciação Científica, que me acolheu em seus projetos e sempre confiou em mim. Ensinou-me diversas coisas valiosas tanto para a carreira, quanto para a vida, dentre elas algo que eu jamais vou esquecer: que mesmo na Ciência as coisas só funcionam quando temos fé! E eu tenho, viu!

Às minhas queridíssimas amigas Su, Bika e Zucco, por todos os momentos em que choramos de tanto rir, momentos em que aguentaram meus estresses, me apoiaram, me incentivaram, dentro e fora do laboratório. A Su com sua nem tão enorme paciência, mas com seu coração gigante! Um exemplo de pessoa dedicada, de amiga. A Bika com seu jeito todo irreverente, ou seria doido, de ser. Pode ter certeza que você alegrou muito meus dias! Vou sentir muito sua falta, sua *monxtra*! A Zucco, que só tem cara de boazinha, e que no começo não gostava de mim, mas que se mostrou uma grande amiga!

Ao pessoal do laboratório por toda ajuda, discussões, festas, por toda a força e incentivo: Talita (por todas as conversas, momentos divertidos e por querer ter um filho igual a mim), Cissa (por sua amizade, sua dedicação, por ser uma pessoa boa e justa), Bia (que no começo parecia metida, mas é uma amiga extremamente querida. Só não a tire do sério!), Fernanda (que pode parecer bravinha, mas é engraçada e divertida), Denise (a avó mais enxuta que eu conheço!), Mari (sempre querida), Bruna (a mais responsável), New (por ser o mais irritado, e o mais engraçado), Ezequiel (por estar sempre disposto a ajudar), Vivi (por ser doidinha e muito animada), Aloísio (por ser um exemplo de profissional, e de ser humano), Giordano (que eu conheço há pouco, mas que já me ensinou muito). Aos mais novinhos Raul, Lucas, Sara, Diego. Aos que já não estão mais, mas que de alguma forma me ajudaram nesse trabalho: Ricardinho, Bruno, Meline, Claudia, Gabi.

Aos grandes professores e pesquisadores que encontrei durante o curso de Biologia, como Paulo Hofmann, Margherita Barracco, Paulo Simões Lopes, Ademir Reis, Edmundo Carlos de Moraes, Daniela De Toni, que indiretamente me

ensinaram o que é ser um bom profissional, e que é preciso ter paixão pelo que se faz!

Aos meus irmãos Denis e Ká, por aguentarem (ou não) meus estresses, pela amizade, incentivo. Em especial aos meus pais, Katia e Valdir, por todo amor, dedicação, doação, apoio em todos os momentos da minha vida. Por serem sempre presentes e me ensinarem as coisas mais importantes da vida. Vocês são os responsáveis por eu ter chegado até aqui. Agradeço imensamente tudo o que vocês fizeram e fazem por mim.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de Iniciação Científica e pelo apoio financeiro aos projetos. Ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT/INFRA), PRONEX/CNPq, CAPES e FAPESC pelo suporte financeiro.

RESUMO

TEIXEIRA, Bianca Luise. **Efeitos do EGF e do FGF2 sobre a diferenciação das células da crista neural truncal de codornas, *in vitro***. Florianópolis, 2009. Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2009.

A crista neural (CN) é uma população de células originadas das margens dorsais do tubo neural durante o desenvolvimento de vertebrados. Essas células possuem um alto potencial migratório e dão origem a múltiplos fenótipos como neurônios, células gliais, melanócitos e a diversos derivados mesenquimais. Sabe-se que essa diversificação de fenótipos é espacialmente e temporalmente influenciada por fatores do microambiente. Vários fatores de crescimento, incluindo o Fator de Crescimento de Fibroblasto-2 (FGF2) e o Fator de Crescimento Epidermal (EGF), têm sido identificados como sendo capazes de direcionar a diferenciação de progenitores multipotentes da CN para tipos celulares específicos. Nesse trabalho avaliamos o papel do FGF2 e do EGF na diferenciação dos progenitores da CN truncal (CNT) de aves, analisando a expressão dos fenótipos celulares: neurônios, células gliais, melanócitos e células musculares lisas. Para isso culturas de células da CNT foram tratadas com FGF2 (20ng/mL) e/ou EGF (10ng/mL). Os tratamentos foram realizados em dois períodos diferentes, durante as primeiras 24h da fase de migração das células da CNT (cultura primária), ou durante as primeiras 24h de cultura secundária (fase de diferenciação), após 15h de migração em cultura primária. As culturas secundárias foram mantidas por mais 6 dias quando as células foram fixadas e analisadas quanto à expressão dos diferentes fenótipos celulares. Os resultados demonstram que o tratamento com FGF2 nas primeiras 24h de cultura primária promoveu um aumento de 3x no número de células gliais em relação ao controle sem tratamento. Já o tratamento com EGF nesse mesmo período aumentou em 2x a proporção de neurônios e melanócitos em relação ao controle. O tratamento concomitante com FGF2 e EGF promoveu um aumento no número de neurônios, sendo que o número de melanócitos e células gliais não foi alterado. O tratamento das células da CNT com ambos os fatores de crescimento, no período de diferenciação, não promoveu alterações significativas na expressão dos fenótipos celulares analisados em relação ao controle. Estes resultados sugerem um efeito importante do FGF2 na diferenciação das células da CNT para o fenótipo glial e do EGF para neurônios e melanócitos. Desta forma, hipotetizamos uma possível ação competitiva desses fatores no progenitor indiferenciado bipotente glia-melanócito, e uma atuação do EGF também em um progenitor não responsivo ao FGF2, envolvido com diferenciação neurogênica. Os resultados sugerem ainda que ambos os fatores de crescimento são fundamentais nas primeiras 15h de migração para a determinação e/ou especificação dos progenitores multipotentes da CN.

Palavras-chave: Crista neural truncal, Diferenciação, Efeitos do microambiente, EGF, FGF2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Formação do tubo neural em embrião de galinha	1
Figura 2.	Esquema das regiões da CN	3
Figura 3.	Figura esquemática da migração das células da CNT	4
Figura 4.	Procedimento para retirada do tubo neural e obtenção das células da CNT	11
Figura 5.	Esquema de barras de tempos de tratamentos	12
Figura 6.	Análise do fenótipo neuronal sob a influência de EGF e/ou FGF2 nas células da CNT na fase de migração.....	16
Figura 7.	Visão macroscópica das células pigmentares derivadas da CNT em cultura	17
Figura 8.	Análise do fenótipo melanocítico sob a influência de EGF e/ou FGF2 nas células da CNT na fase de migração	19
Figura 9.	Análise do fenótipo glial sob a influência de EGF e/ou FGF2 nas células da CNT na fase de migração	20
Figura 10.	Análise do fenótipo músculo liso sob a influência de EGF e/ou FGF2 nas células da CNT na fase de migração	21
Figura 11.	Esquema de ação dos fatores FGF2 e EGF sobre a diferenciação das células da CNT de codornas, <i>in vitro</i>	24
Figura 12.	Modelo de linhagens celulares na CNT	25

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MEM	Meio Mínimo Essencial Modificado Alfa
ANOVA	Análise de Variância
BMP	Proteína Morfogenética de Osso
CN	Crista Neural
CNC	Crista Neural Cefálica
CNT	Crista Neural Truncal
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
EDTA	Ácido etilanodiamino tetra-acético
EE	Extrato de Embrião
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
FGF2	Fator de Crescimento de Fibroblasto tipo 2
Ig	Imunoglobulina
MEC	Matriz Extracelular
NGF	Fator de crescimento de nervo
PBS	Tampão Fosfato Salina
PBS Triton	PBS contendo 0,25% de Triton X100
PBS Tween	PBS contendo 0,05% de Tween 20
SBF	Soro Bovino Fetal
SMA	Actina de Músculo Liso
SMP	Proteína Mielínica de Célula de Schwann
SNC	Sistema Nervoso Central
T3	3-3'-5 triiodo-L-thironina
TGF β	Fator de Crescimento Transformador Beta
TxRed	Vermelho do Texas

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. A Crista Neural	1
1.2. Multipotencialidade da CN	4
1.3. Diferenciação celular	6
1.4. Fator de Crescimento de Fibroblasto tipo 2 (FGF2) e Fator de Crescimento Epidermal (EGF).....	7
2. Objetivos	9
2.1. Objetivo Geral	9
2.2. Objetivos Específicos	9
3. Materiais e Métodos	10
3.1. Animais	10
3.2. Cultura de células da CNT de codornas	10
3.2.1. Cultura Primária	10
3.2.2. Cultura Secundária	11
3.3. Tratamento das Culturas de Células com FGF2 e/ou EGF	12
3.4. Análise Fenotípica	12
3.5. Análise Estatística	13
4. Resultados	14
4.1. Efeitos do FGF2 e do EGF sobre a diferenciação das células da CNT <i>in vitro</i>	14
4.1.1. EGF estimula a diferenciação das células da CNT para o fenótipo neuronal	14
4.1.2. EGF estimula a diferenciação de melanócitos a partir das células da CNT	17
4.1.3. FGF2 estimula a diferenciação das células da CNT para o fenótipo glial	19
4.1.4. FGF2 e EGF não estimulam a diferenciação de células musculares lisas a partir das células da CNT.....	20
5. Discussão	22
6. Conclusões	26
Referências Bibliográficas	27
Anexo	31

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Crista Neural

A Crista Neural (CN) é uma estrutura embrionária transitória formada por uma população de células altamente multipotentes originadas das bordas dorsais do tubo neural dos vertebrados durante o processo de neurulação. Nesse processo as pregas da placa neural dobram-se uma em direção a outra formando o tubo neural. As pregas neurais formam-se na interface entre a ectoderme não-neural e a região dorsal do futuro tubo neural, e a interação entre esses dois tecidos é necessária para a indução da CN ao longo da linha média dorsal (Fig. 1) (Le Douarin e Kalcheim, 1999).

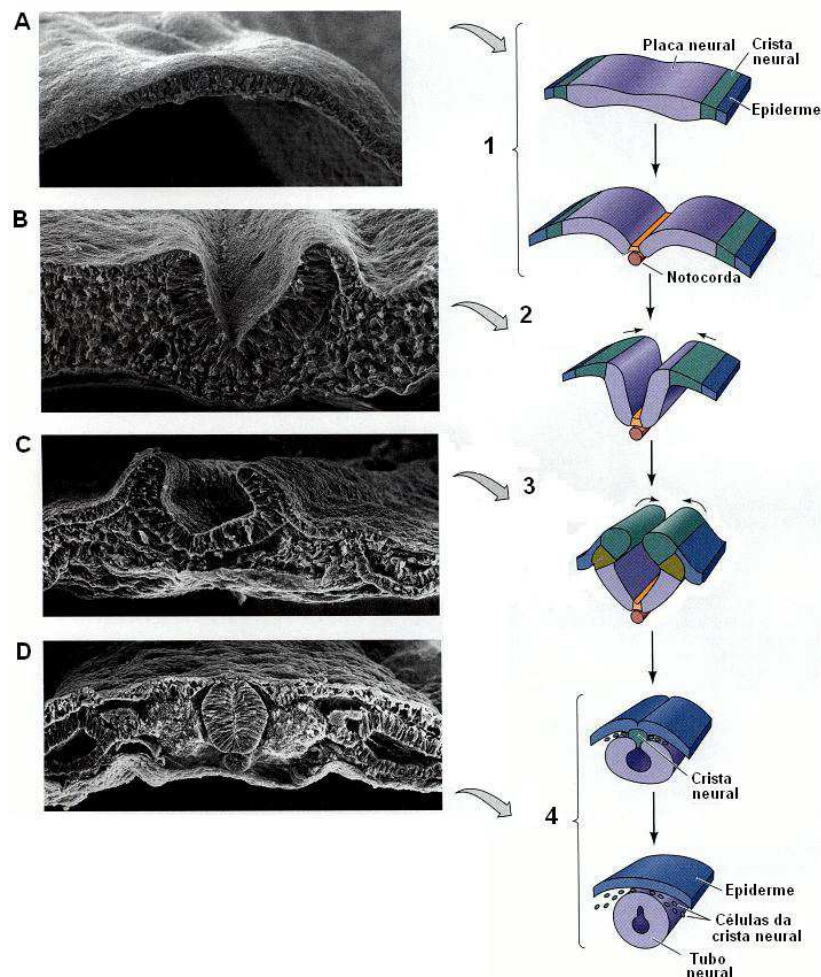


Figura 1. Formação do tubo neural em embrião de galinha. (A1) As células da placa neural podem ser distinguidas como células alongadas na região dorsal da ectoderme. (B2; C3) A dobra neural eleva-se como epiderme presuntiva e continua a se mover em direção ao dorso medial. (D4) As dobras neurais entram em contato uma com a outra, e as células da crista neural são especificadas nesta região. As células da crista neural então se dispersam e o tubo neural separa-se da epiderme (Adaptado de Gilbert, 2000).

Durante o processo de indução, as células da CN sofrem uma transição epitélio-mesenquimal e desprendem-se do neuroepitélio de origem, assumindo um caráter altamente migratório. Essas células irão migrar por rotas específicas no embrião, originando uma grande diversidade de tipos celulares em diversos órgãos e estruturas do corpo (Le Douarin e Kalcheim, 1999).

Para que ocorra o processo de delaminação e migração das células da CN são necessárias alterações significativas nos padrões da citoarquitetura e da adesão celular (Trainor, 2005). Estes fenômenos dependem de uma modificação na expressão de moléculas de adesão, como as caderinas. Durante sua indução, migração e diferenciação, as células da CN expressam diferentes caderinas, que variam durante os diversos períodos do desenvolvimento. No processo de migração das células da CN ocorre uma perda de expressão das N-caderinas, promovida por uma ação coordenada pela sinalização da via de BMP e processamento proteolítico dessas moléculas de adesão da superfície da célula (Taneyhill, 2008).

No embrião de aves, a migração das células da CN ocorre após o fechamento do tubo neural, primeiramente na região anterior e progressivamente estende-se para a região caudal. Já no embrião de camundongos, a migração da CN inicia logo após a fusão das metades bilaterais da placa neural na região caudal do mesencéfalo e rostral do rombencéfalo (Trainor, 2005). Trabalhos do grupo da Profa. Dra. Nicole Le Douarin, utilizando o modelo de quimeras galinha-codorna, demonstraram que as células da CN migram por rotas migratórias bem definidas. Isso possibilitou a identificação e a construção de mapas de destino mais precisos dos derivados da CN (Le Douarin e Kalcheim, 1999).

Ao longo do eixo ântero-posterior, dependendo da posição de origem das células da CN, ela pode ser dividida em grandes domínios funcionais que se sobrepõem em certos trechos: cefálica, vagal, cardíaca, truncal e sacral (Fig. 2). Estas diferentes populações de células da CN seguem diversos caminhos de migração e originam diferentes tipos celulares (Gilbert, 2000).

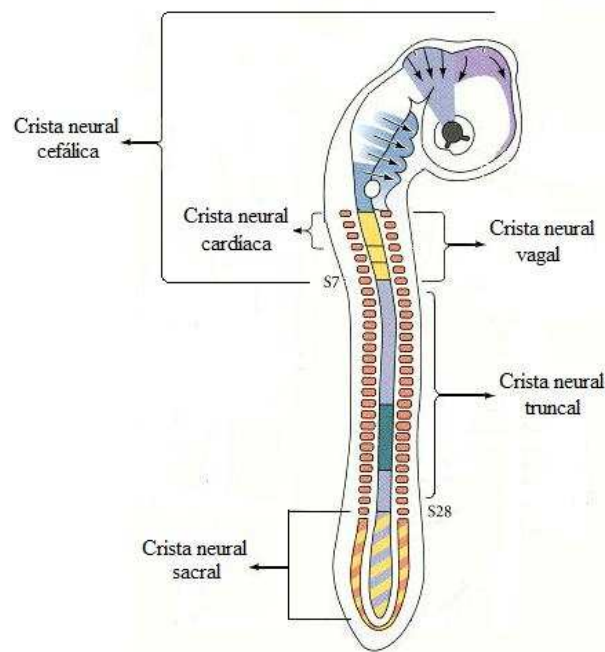


Figura 2. Esquema das regiões da CN. (Adaptado de Gilbert, 2000)

A região cefálica da CN dá origem a neurônios, células gliais, melanócitos, células musculares lisas, adipócitos e a quase todo tecido conjuntivo e esquelético da cabeça, face e pescoço (Le Douarin e Kalcheim, 1999, Le Douarin *et al.*, 2008). As células da CN vagal, que também fazem parte da região cefálica, e as células da região sacral contribuem para a formação do sistema nervoso entérico. CN cardíaca, por sua vez, é o nome dado a uma região caudal da CN cefálica, pois as células dessa região povoam o septo cardíaco, que separa a circulação pulmonar da aorta, assim como dão origem a melanócitos, ao músculo liso do arco aórtico, e a gânglios parassimpáticos cardíacos (Le Douarin e Kalcheim, 1999; Snider *et al.*, 2007).

Já as células da região truncal, dão origem a neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico, assim como células pigmentares da pele. Nessa região, as células da CN truncal (CNT) migram ao longo de duas vias principais no embrião. A primeira onda-migratória é dorso-ventral sobre o esclerotomo, dando origem a neurônios sensoriais e simpáticos e células gliais. A segunda onda migratória toma uma rota dorsolateral, entre a derme e a epiderme, em que as células da CN se instalam sob o ectoderma, dando origem aos melanócitos da pele (Fig. 3) (Gilbert, 2000).

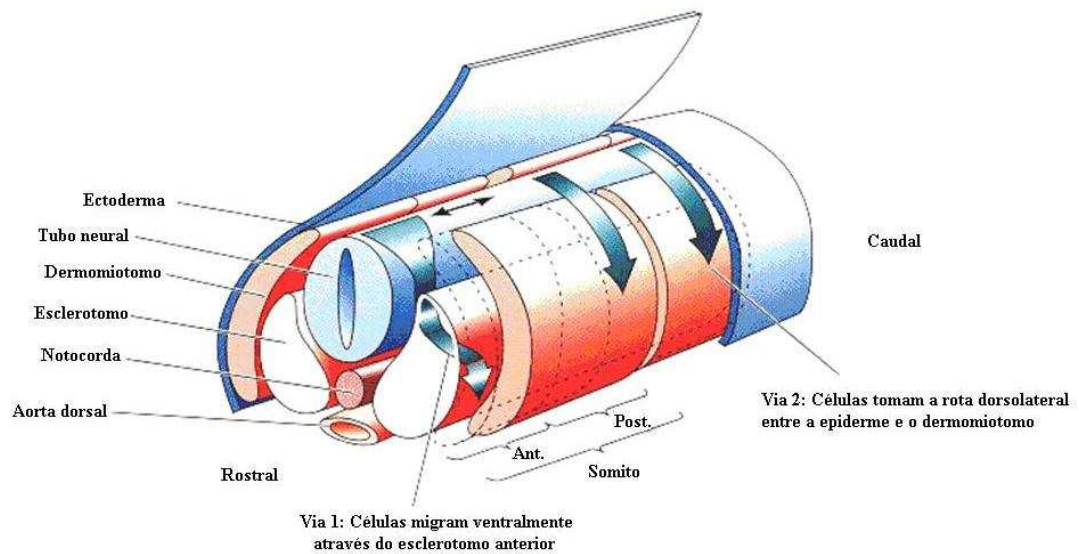


Figura 3: Figura esquemática da migração das células da CNT. Na Via 1 as células migram ventralmente através do esclerotomo anterior (a porção do somito que origina a cartilagem vertebral). Estas células inicialmente saem da porção posterior do esclerotomo migram ao longo do tubo neural indo para a região anterior oposta e contribuem para a formação dos gânglios simpáticos e parassimpáticos bem como, das células medulares adrenais e gânglios da rota dorsal. Pouco tempo depois, outras células da CNT entram na Via 2 e migram ao longo da rota dorsolateral, abaixo da ectoderme e tornam-se melanócitos produtores de pigmentos (Bittencourt, 2007, adaptado de Gilbert, 2000).

1.2. Multipotencialidade da CN

A ampla capacidade de diferenciação das células da CN deve-se a uma heterogeneidade dessa população celular, incluindo células altamente multipotentes, células oligopotentes e progenitores já comprometidos com uma linhagem celular, que se diferenciam em neurônios (N), células gliais (G), melanócitos (M), células musculares lisas (F), condrócitos (C) e osteócitos (O) (Trentin *et al.*, 2004; Calloni *et al.*, 2009).

Os primeiros experimentos demonstrando a multipotencialidade das células da CN foram realizados *in vitro* a partir de embriões de codorna, analisando-se o potencial de desenvolvimento das células da CN por meio de clonagem de células (Cohen e Konigsberg, 1975). Nesses experimentos células isoladas deram origem a três tipos de clones: contendo somente células melanocíticas ou neurônios adrenérgicos, e clones contendo os dois tipos celulares.

Somente 13 anos mais tarde a multipotencialidade das células da CNT foi demonstrada *in vivo* a partir da microinjeção de células da CN marcadas com dextrana conjugada à rodamina, em embriões. Esses experimentos demonstraram a marcação de um grande número de descendentes de linhagens distintas de células, incluindo os neurônios sensoriais, glia, melanócitos, e células adrenomedulares (Bronner-Fraser e Fraser, 1988).

De maneira semelhante à CNT, a CN cefálica (CNC) dá origem a uma variedade de tipos celulares, porém, apenas as células da região cefálica possuem a capacidade de gerar cartilagem, osso, tecido conjuntivo e células musculares lisas *in vivo*. A primeira evidência da existência de precursores comuns entre linhagens neurais e mesectodermais da CNC foi obtida por Barroffio e colaboradores (1991), com a identificação de um precursor multipotente comum para glia, neurônio, melanócito e cartilagem (GNMC).

Estudos *in vitro*, a partir de células de embriões de codorna, feitos por Trentin e colaboradores (2004) demonstraram a existência de outros dois precursores altamente multipotentes: o primeiro originando glia, melanócito, músculo liso e cartilagem (GMFC) (na região cefálica), e o segundo originando glia, neurônio, melanócito e músculo liso (GNMF) (identificado tanto na região cefálica, quanto truncal). Foi também verificada a capacidade de auto-renovação dos progenitores bipotentes glia-melanócito (GM) e glia-músculo liso (GF), em ambas as regiões, que desse modo apresentam todas as propriedades de célula-tronco. Calloni e colaboradores (2009), através de ensaios de clonagem celular da CNC, identificaram um progenitor hexapotente, capaz de originar células gliais, neurônios, melanócitos, células de músculo liso, condrócitos e osteócitos (GNMFCO).

O destino dos precursores multipotentes da CN depende, além da região de onde emergem, da rota que as células utilizam para migrar e do lugar em que essas células se estabelecem. Desse modo, sinais do microambiente dos sítios de migração e do destino final exercem papel fundamental neste processo (Gilbert, 2000). Um dos fatores responsáveis por controlar o destino de diferenciação celular dos progenitores multipotentes da CN são as moléculas de matriz extracelular (MEC) (Costa-Silva *et al.*, 2009). Essas macromoléculas possuem uma organização capaz de influenciar o citoesqueleto e o comportamento celular através da ligação de receptores de superfície que irão ativar várias vias intracelulares (Alberts *et al.*, 2006). Trabalhos recentes do nosso laboratório revelaram que a MEC influencia a

proliferação e diferenciação das células da CN de modo similar em aves e mamíferos. Através de análises clonais de células da CNT mostraram que a fibronectina induz ao aumento da proporção de progenitores unipotentes e oligopotentes com potencial para o desenvolvimento de células de músculo liso (Costa-Silva *et al.*, 2009).

1.3. Diferenciação celular

Diferenciação celular é um conjunto de processos dinâmicos que levam uma célula indiferenciada a tornar-se especializada e capaz de executar atividades específicas. Para isso há inativação de certos grupos de genes e ativação de outros, o que permite a produção seletiva de proteínas celulares imprescindíveis para funções específicas da célula após o processo de diferenciação. A diferenciação celular é controlada por fatores intra e extracelulares, requerendo intensa comunicação célula-célula e célula-ambiente (Junqueira e Carneiro, 2000).

Segundo Le Douarin e Kalchek (1999) a diferenciação das células da CN é determinada por fatores intrínsecos às células, e também pelo microambiente de cada rota de migração. Dentre os fatores extracelulares mais estudados que influenciam na especificação da CN pode-se destacar membros da família Wnt na diferenciação de melanócitos (Dorsky *et al.*, 1998), NGF, FGFs e BMPs na diferenciação de linhagens neuronais (Reissmann *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1999; Forander *et al.*, 2001), neuregulina-1 e ligantes de *Notch* na diferenciação de células gliais (Shah *et al.*, 1994), TGF β na diferenciação de músculo liso (Li *et al.*, 2007) e Sonic Hedgehog na diferenciação de condrócitos (Brito *et al.*, 2006; Calloni *et al.*, 2007).

Apesar da importância para diferenciação das células da CN, mutantes para as vias dos fatores como Wnt, FGFs, BMPs e *Notch* não apresentam uma completa ausência da formação das células da CN, sugerindo que provavelmente há certa redundância nesses mecanismos de sinalização no que diz respeito à CN (Crane e Trainor, 2006).

1.4. Fator de Crescimento de Fibroblasto tipo 2 (FGF2) e Fator de Crescimento Epidermal (EGF)

Os fatores de crescimento de fibroblasto (FGFs) compreendem uma família de fatores envolvidos em inúmeros processos do desenvolvimento. Esse fator é capaz de influenciar a manutenção da plasticidade celular e modular a diferenciação de vários tipos celulares (Chiou *et al.*, 2006; Dailey *et al.*, 2005).

A família do FGF, assim como de TGF β , BMPs e de Wnt, compreendem moléculas envolvidas nas principais vias de sinalização tanto para a indução da CN, quanto para migração e diferenciação dessas células. Estudos demonstraram que a sinalização por essas moléculas é crítica para o processo de desenvolvimento de estruturas derivadas da CNC, em especial o esqueleto facial e elementos de cartilagem da cabeça (Taneyhill e Bronner-Fraser, 2006). Já nas células da CNT, estudos recentes de nosso laboratório demonstraram que o FGF2 exerce uma grande influência sobre os progenitores dessa população celular estimulando a renovação e proliferação de alguns progenitores mais indiferenciados (GMF, GNF e GMNF) (Bittencourt, 2007).

O fator de crescimento epidermal (EGF), polipeptídeo constituído por 53 resíduos de aminoácidos, possui um importante papel nos processos do desenvolvimento, assim como a família FGF. Os dois fatores estimulam a proliferação de uma grande variedade de células, inclusive de precursores neurais *in vitro* (Kilpatrick e Bartlett, 1995). Estudos mostram uma grande importância do EGF na proliferação de células tumorais, estando alguns de seus receptores presentes em altos níveis em tumores de cabeça e pescoço, inclusive em neuroblastoma periférico, tipo de tumor derivado de células da CN. A expressão dos receptores de EGF em tumores tem sido correlacionada com progressão do tumor, baixa sobrevivência, baixa resposta a terapias e resistência a agentes citotóxicos (Ho *et al.*, 2005). Estudos sugerem ainda que a expressão de receptores de EGF está relacionada com a determinação da via de migração das células da CNC, tendo ratos *knockout* (KO) para esses receptores exibido uma migração anormal dessa população celular (Goldin *et al.*, 2000).

Trabalhos realizados por Erickson e Turley (1987) sugerem que o EGF esteja envolvido na secreção de proteoglicanos por células da CNT de codornas *in vitro*.

Os proteoglicanos, principalmente os proteoglicanos de heparan sulfato, são classicamente descritos como co-receptores de FGFs (Bernfield e Hooper, 1991). Com base nesses dados, pode-se pensar num possível mecanismo de ação coordenado entre EGF e FGF2. Todavia, apesar de muito estudado em vários sistemas biológicos, o provável envolvimento do EGF nos processos de diferenciação das células da CN não é claro.

Mesmo com avanços na compreensão dos componentes do microambiente envolvidos na morfogênese dos derivados da CN, pouco se sabe sobre a influência que o EGF e o FGF2 exercem sobre o processo de migração, proliferação e diferenciação das células da CNT. O conhecimento sobre como esses fatores interferem na morfogênese e no potencial plástico dessas células é de fundamental importância para entendermos mais sobre a biologia das células da CNT.

Elucidar os mecanismos que regulam a diferenciação das células da CN é o primeiro passo para uma futura aplicação em processo de terapias celulares de patologias que envolvam os derivados da CN, seja através de recrutamento e diferenciação de células tronco armazenadas em um tecido, ou até mesmo conversão de células já diferenciadas de um determinado tipo para um diferente fenótipo funcional.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a influência dos fatores de crescimento FGF2 e EGF na diferenciação das células da CNT de embriões de codornas, em cultura.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a ação do EGF e do FGF2 na diferenciação das células da CNT para os fenótipos de neurônio, melanócito, célula glial e músculo liso, no momento da migração dessas células a partir do tubo neural. Para isso, culturas em massa de células da CNT foram submetidas a tratamentos com EGF e/ou FGF2 durante 24h da fase de migração (cultura primária).
- Analisar a ação do EGF e do FGF2 na diferenciação das células da CNT, após a migração dessas células, em um período de diferenciação celular. Para isso, culturas em massa de células da CNT foram submetidas a tratamentos com EGF e/ou FGF2 durante as primeiras 24h da fase de diferenciação celular (cultura secundária), após 15h de migração.
- Verificar a ação combinada de EGF e FGF2 sobre as células da CNT em cultura, através de tratamento concomitante dos dois fatores de crescimento durante a fase de migração dessas células.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados embriões de codornas (*Coturnix coturnix japonica*) no estágio de desenvolvimento de 20-25 somitos. Os ovos fertilizados foram obtidos no biotério do Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular e Molecular, no Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, da Universidade Federal de Santa Catarina, onde os animais são mantidos em ciclo de claro/escuro de 12 horas, possuindo água e ração *ad libitum*. O período de incubação dos ovos foi de 48 horas a 37,5°C em chocadeira com umidade relativa de 65%.

A utilização destes animais está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de ética no Uso de Animais (CEUA)/UFSC, em 09 de julho de 2007, sob o protocolo de pesquisa/ensino número PP00103/CEUA/UFSC.

3.2. Cultura de células da CNT de codornas

Foram feitos dois tipos de culturas da crista neural truncal de codornas, sendo uma primária e outra secundária. Os tempos para cultura primária foram de 15 ou 24h. Já as culturas secundárias levaram de 5 a 6 dias.

3.2.1. Cultura primária

Para obtenção de embriões de codornas no estágio de 20-25 somitos os ovos foram incubados por 48h a 37,5°C, e os explantes de tubo neural foram isolados para obtenção de células da CN da região truncal dos embriões. Os tubos neurais foram então dissecados sob observação em microscópio estereoscópico (Olympus) para retirada dos tecidos circundantes, na presença de pancreatina (6,25g/L, Sigma) e com o auxílio de agulhas entomológicas de tungstênio. Os tubos neurais foram então colocados em placas de cultura de 35 mm de diâmetro (Corning, NY, USA) em meio de cultura *α -modified minimum essential* (α -MEM; Gibco-BRL, Grand Island, NY), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultlab), 2% de extrato de embrião de galinha (EE), penicilina (200 U/mL) e estreptomicina (10 μ g/mL) (Fig. 4). A cultura foi mantida em estufa úmida à 37°C e 5% CO₂ em ar atmosférico.

3.2.2. Cultura Secundária

Os explantes do tubo neural foram removidos após o período determinado para cada experimento (15 ou 24h) e descartados. As células remanescentes, que correspondem às células da CNT, foram tripsinizadas com solução de tripsina a 0,25% (Sigma) e ácido etilenodiamino tetra-acético a 0,02% (EDTA, Vetec) em tampão fosfato salina (PBS), pH 7,4 e recuperadas através de bloqueio em meio contendo 10% de SBF seguido de centrifugação (500 X g por 5 min). As células foram ressuspensas e semeadas em gotas de 30µl contendo 300 células, em placas de 35 mm. A cultura foi mantida por 5 ou 6 dias em meio complexo composto por α -MEM, contendo 10% de SFB, 2% de EE, hidrocortisona (0,1µg/mL), transferrina (10 µg/mL), insulina (1 ng/mL), 3-3'-5 triiodo-L-thironina (T₃) (0,4 ng/mL), glucagon (0,01 ng/mL), EGF (0,1ng/mL), FGF2 (0,2ng/mL), penicilina (200 U/mL) e estreptomicina (10 µg/mL), em estufa úmida à 37°C e 5% CO₂ em ar atmosférico. Houve troca de meio de cultivo a cada dois dias. Em seguida as células foram fixadas e submetidas à análise fenotípica (Dupin *et al.*, 1990; Trentin *et al.*, 2004) (Fig. 4).

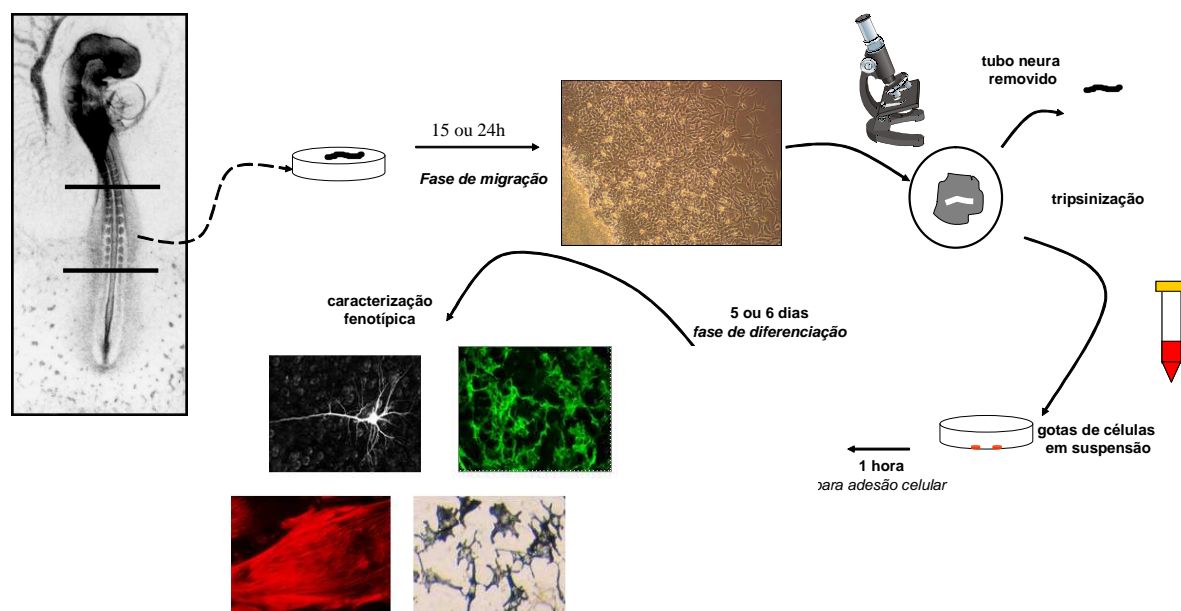


Figura 4. Procedimento para retirada do tubo neural e obtenção das células da CNT. O tubo neural da região trunca de um embrião de codorna com 48 horas de desenvolvimento é retirado, dissecado e plaqueado. Após as 24h ou 15h em que as células da crista neural migram do tubo neural, este é removido. As células remanescentes são tripsinizadas, centrifugadas e plaqueadas em gotas de 30µl em uma densidade de 10 células/µl. Após 1 hora para adesão celular, o meio de cultura é acrescentado. A caracterização fenotípica se dá após 5 ou 6 dias de cultura secundária (fase de diferenciação).

3.3. Tratamento das culturas celulares com EGF e/ou FGF2

Os tratamentos foram realizados em 2 períodos diferentes da cultura (Fig 5). Um dos tratamentos ocorreu durante a fase de migração (durante as 24h de cultura primária), onde foi adicionado ao meio de cultura EGF (10ng/ml; Sigma) e/ou FGF2 (20ng/ml; Sigma) (Fig. 5A). Após o período de migração os meios de cultura foram trocados, e a cultura mantida com o meio complexo descrito anteriormente.

Alternativamente, tratamentos com EGF (10ng/ml) e/ou FGF2 (20ng/ml) foram realizados nas primeiras 24h da cultura secundária, após apenas 15h de cultura primária (Fig. 5B). A seguir, os meios foram trocados e as culturas permaneceram por mais 5 dias com o meio complexo descrito acima.

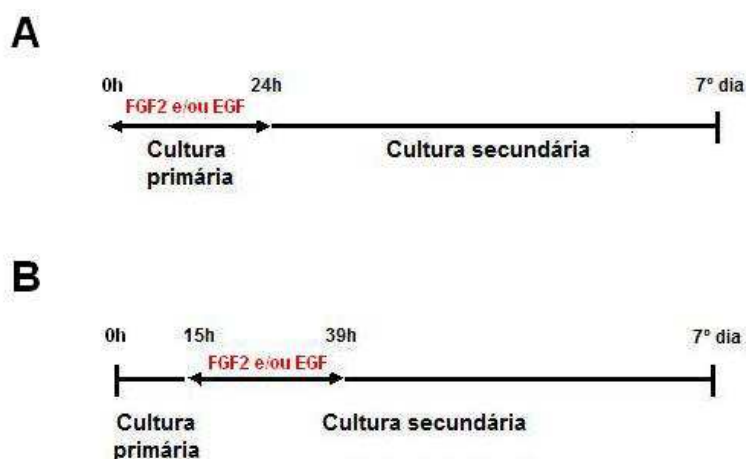


Figura 5. Esquema de barras de tempos de tratamentos. As linhas representam todo o período de cultura, mostrando os horários utilizados para tratamento com FGF2 e/ou EGF. (A) Tratamento durante 24h de cultura primária. (B) Tratamento durante as primeiras 24h de cultura secundária, após 15h de cultura primária.

3.4. Análise fenotípica

A análise fenotípica foi avaliada por imunocitoquímica para fluorescência. As culturas foram fixadas com paraformaldeído (PF) a 4% durante 30 min e, a seguir, lavadas três vezes com tampão fosfato salina (PBS). As células, após fixação, foram permeabilizadas com solução de PBS-Triton X-100 0,25% por 30min a temperatura ambiente. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 10% de SFB em PBS durante 30 min. As células foram então lavadas repetidamente com PBS e

incubadas por 1 hora, a 37° C, com marcadores específicos para os diferentes fenótipos que a CNT pode originar. As células gliais foram identificadas com o anticorpo IgG1 desenvolvido em camundongo contra proteína mielínica, específico para célula de Schwann de aves (SMP) (1:200; Hybridoma bank) (Dulac *et al.*, 1992) para marcação das células gliais. Para reconhecimento das células de músculo liso, foi utilizado um anticorpo monoclonal IgG2a anti-alfa actina de músculo liso (alfa SMA) (1:300; Sigma). Os neurônios foram detectados através do anticorpo monoclonal IgG1 anti-tubulina tipo Beta-III (1:2000; Promega).

As células foram então lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/Tween) (Sigma) e subsequente incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente, com os anticorpos secundários desenvolvidos em cabra contra IgG1 de camundongo conjugado à biotina, seguido de incubação com estreptavidina conjugada à peroxidase (1:150, 1h; PerkinElmer) e Tyramida (1:200, 30 min.; PerkinElmer). Outros anticorpos secundários utilizados foram desenvolvidos em cabra contra IgG1 de camundongo conjugado a Texas red (TxRed 1:100; Sigma) e contra IgG2a de camundongo conjugado a Texas red (TxRed 1:300; Sigma). As células foram então novamente lavadas com PBS e incubadas com corante fluorescente nuclear com 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido – DAPI (1µg/ml; Sigma). O fenótipo melanocítico foi analisado através da expressão do pigmento melanina, em microscópio de contraste de fase (Olympus CK 40). Foi realizada também quantificação macroscópica das células pigmentares pela avaliação da intensidade da expressão de melanina através do software Scion Image (National Institutes of Health). As placas foram montadas com glicerina tamponada (pH 9,0), observadas e fotografadas em microscópio epifluorescente invertido (Olympus IX71). O número total de células foi obtido por contagem direta dos núcleos. As proporções dos fenótipos foram analisadas pela relação entre o número total de células e o número de células marcadas.

3.5. Análise Estatística

As significâncias das diferenças foram avaliadas por ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey através de software estatístico GraphPad Prism 4®. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos do FGF2 e do EGF sobre a diferenciação das células da CNT *in vitro*.

Sabe-se que o processo de diferenciação celular é determinado por fatores intrínsecos à célula e também por fatores extrínsecos, dentre eles os fatores de crescimento. Vários estudos relacionam diversos fatores de crescimento com a indução de determinados fenótipos derivados da CN. Apesar de bastante estudados em outros sistemas, pouco se conhece sobre as funções do EGF e do FGF2 nos processos de diferenciação das células da CN.

Com o intuito de analisar os efeitos do FGF2 e do EGF sobre a diferenciação das células da CNT foram realizadas culturas de células da CNT de embriões de codorna. As células foram tratadas em intervalos de tempo e concentrações específicas destes dois fatores de crescimento. Os tratamentos foram realizados nas primeiras 24h da cultura primária, durante a fase de migração das células da CNT a partir do tubo neural ou nas primeiras 24h de cultura secundária, após um período de 15h de migração na cultura primária. Após o período de cultura e fixação das células, foram feitas marcações imunocitoquímicas e análises da expressão dos marcadores celulares dos derivados da CN (glia, músculo liso, neurônio e melanócitos).

4.1.1. EGF estimula a diferenciação das células da CNT para o fenótipo neuronal.

Tanto os tratamentos realizados com FGF2, quanto os tratamentos realizados com EGF apresentaram efeitos significativos sobre a diferenciação das células da CNT, porém, só foi possível observar estes efeitos quando os tratamentos foram realizados na fase de migração das células da CN, na cultura primária. Os tratamentos com EGF e/ou FGF2 durante as primeiras 24h de cultura secundária (após um período de 15h de migração) não alteraram de forma significativa a proporção de diferenciação para nenhum dos fenótipos analisados (glia, neurônio, célula de músculo liso e melanócito) (dados não mostrados).

Com relação ao fenótipo neuronal, houve um aumento significativo no número de neurônios após tratamento com EGF nas primeiras 24h de cultura primária. Na condição controle cerca de 1% das células era neurônios. Após o tratamento com EGF essa proporção passou a ser de 3%, mostrando um aumento significativo na

proporção desse fenótipo em relação à condição controle. Já o tratamento com FGF2 não foi capaz de alterar a proporção de neurônios em relação à condição controle (Fig. 6).

Surpreendentemente, o efeito do EGF sobre o fenótipo neuronal não foi bloqueado pela presença do FGF2. Quando as células da CNT forma tratadas com EGF+FGF2, foi observado um aumento de 4x na proporção de neurônios em relação ao controle, semelhante ao observado no tratamento apenas com EGF (Fig. 6).

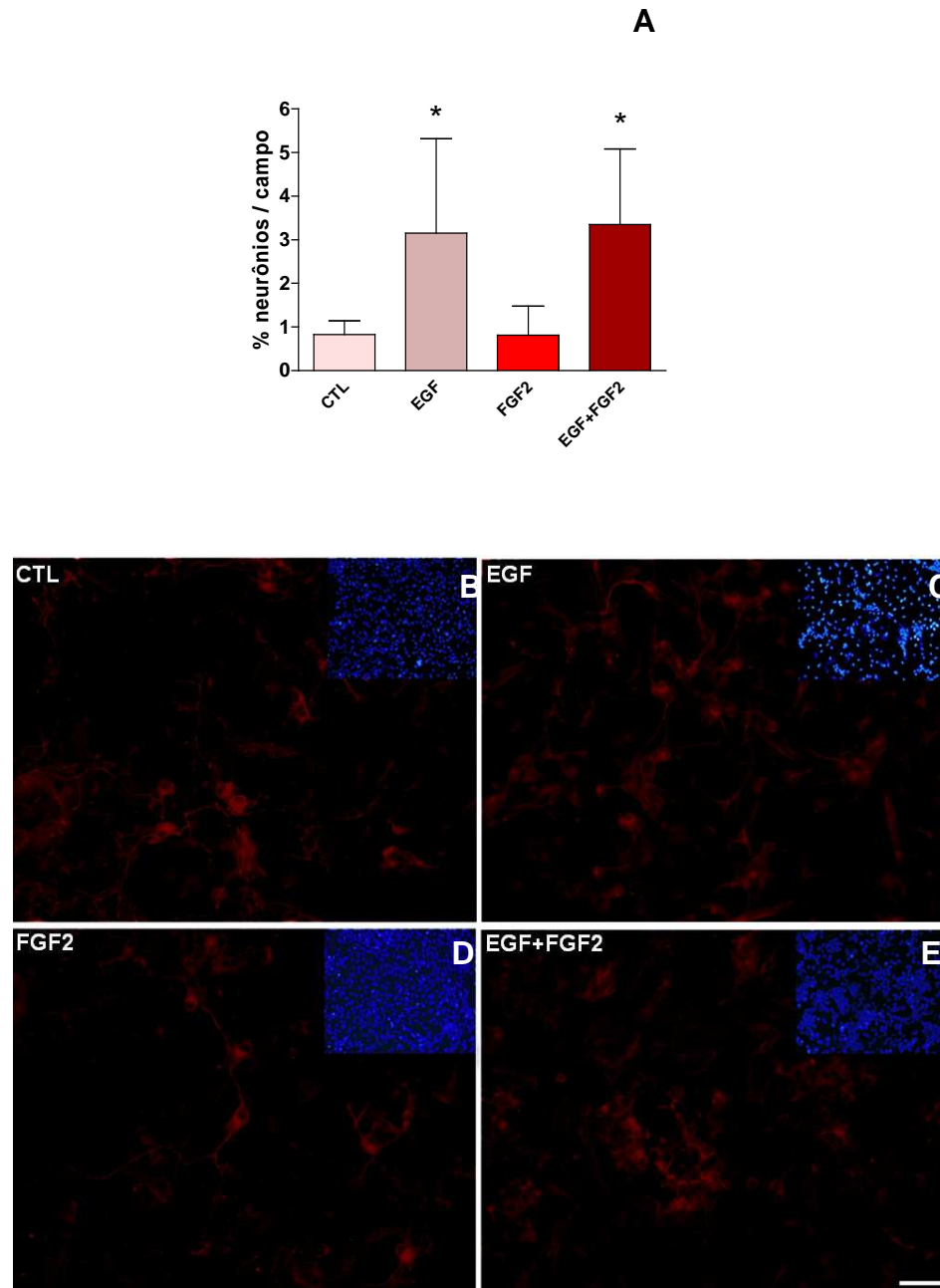


Figura 6. Análise do fenótipo neuronal sob a influência de EGF e/ou FGF2 nas células da CNT na fase de migração. (A) Gráfico da análise da porcentagem de neurônios a partir de culturas controle e tratadas com FGF2 (20ng/mL) e EGF (10ng/mL) apenas nas primeiras 24h de cultura primária. Resultado expresso como proporção de neurônios, contando-se 60 campos aleatórios em 10 experimentos independentes. Os resultados representam a proporção da média \pm desvio padrão. *P < 0,05 por ANOVA. (B-E) Imunofluorescência indireta utilizando-se anticorpo anti- β -tubIII para identificação das células neurais (vermelho) e DAPI (azul) para marcação dos núcleos totais (Aumento: 200x).

4.1.2. EGF estimula a diferenciação de melanócitos a partir das células da CNT.

Os melanócitos, fenótipo derivado da CN, possuem uma característica peculiar pelo fato de expressarem o pigmento melanina. Estas células podem ser facilmente visualizadas em cultura pela coloração castanho escuro que a presença da melanina lhes confere. Quando em alta densidade, essas células podem ser visualizadas macroscopicamente (Fig. 7A)

Utilizando-se dessa característica peculiar, a densidade total de melanócitos em cultura foi analisada após tratamento com EGF e FGF2, ambos apenas nas primeiras 24h da cultura. As células tratadas com EGF apresentaram um aumento de 2,6x no número de melanócitos (fator medido pela densidade óptica das culturas) (Fig. 7B).

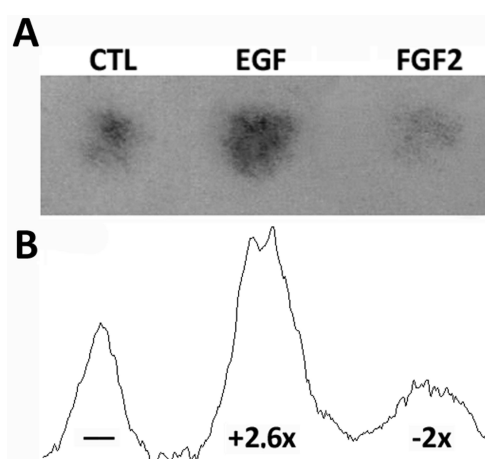


Figura 7. Visão macroscópica das células pigmentares derivadas da CNT em cultura. (A) O tratamento com EGF nas primeiras 24h de cultura estimulou o aumento das células pigmentares na ordem de 2,6x. O tratamento com FGF2 leva a uma redução desse tipo celular na ordem de 2x. (B) Quantificação densitométrica da imagem A.

O resultado das observações macroscópicas das células pigmentares foi confirmado pela quantificação direta em microscópio. Após 24h de migração 5% da população celular era composta por melanócitos. Essa proporção foi de 13% em culturas tratadas com EGF. Esses dados revelam um aumento de cerca de 2,5x na proporção do fenótipo melanocítico em relação à condição controle (Fig. 8).

É importante salientar que tanto o tratamento com FGF2, quanto o tratamento concomitante com FGF2 e EGF não foram capazes de alterar as proporções de melanócitos. Este último resultado mostra que o FGF2 tem a capacidade de inibir o efeito pró-melanocítico do EGF (Fig. 8)

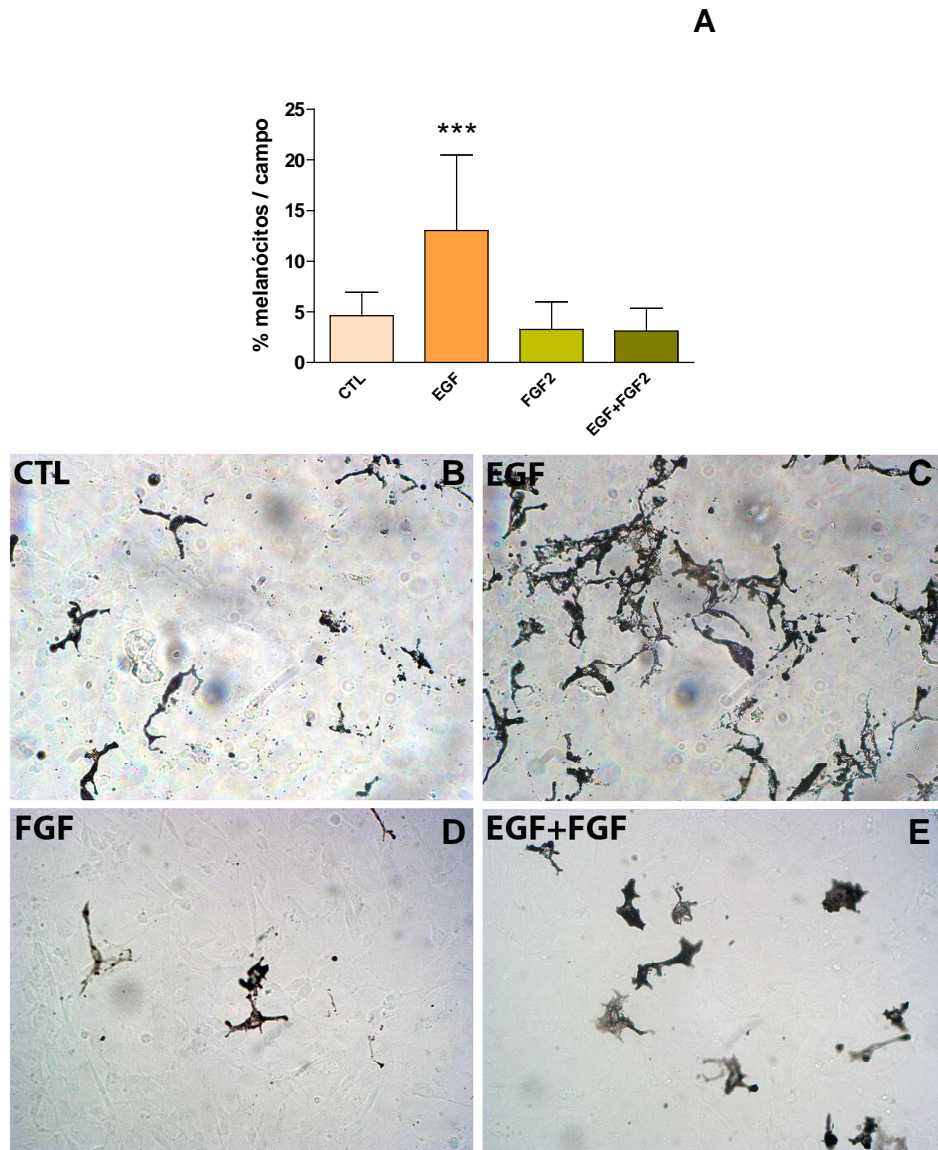


Figura 8. Análise do fenótipo melanocítico sob a influência de EGF e/ou FGF2 nas células da CNT na fase de migração. (A) Gráfico da análise da porcentagem de melanócitos a partir de culturas controle e tratadas com FGF2 (20ng/mL) e EGF (10ng/mL) apenas nas primeiras 24h de cultura primária. Resultado expresso como proporção de melanócitos, contando-se 60 campos aleatórios em 10 experimentos independentes. Os resultados representam a proporção da média \pm desvio padrão. *** $P < 0,001$ por ANOVA. (B-E) Análise da expressão do pigmento melanina, em microscópio de contraste de fase (Aumento: 200x).

4.1.3. FGF2 estimula a diferenciação das células da CNT para o fenótipo glial.

Com relação às células gliais, a maior proporção desse fenótipo foi observada após o tratamento com FGF2. A condição controle apresentou 17% de células gliais em relação à população total. As culturas tratadas com FGF2 apresentaram 33% do mesmo fenótipo. Esses resultados demonstram um aumento cerca de 2x na proporção de células gliais em relação à condição controle. Em contrapartida, o tratamento com EGF não alterou a expressão do fenótipo glial (Fig. 9).

Quando realizado o tratamento concomitante com FGF2 e EGF houve um bloqueio do efeito pró-gliogênico do FGF2, já que esse tratamento não alterou de forma significativa a proporção de células gliais (Fig. 9).

Os dados obtidos indicam um importante papel do FGF2 sobre a diferenciação das células gliais derivadas da CNT. Interessantemente, esse efeito pró-gliogênico do FGF2 e os efeitos pró-melanogênico e pró-neurogênico do EGF são restrito às primeiras 24h de cultivo.

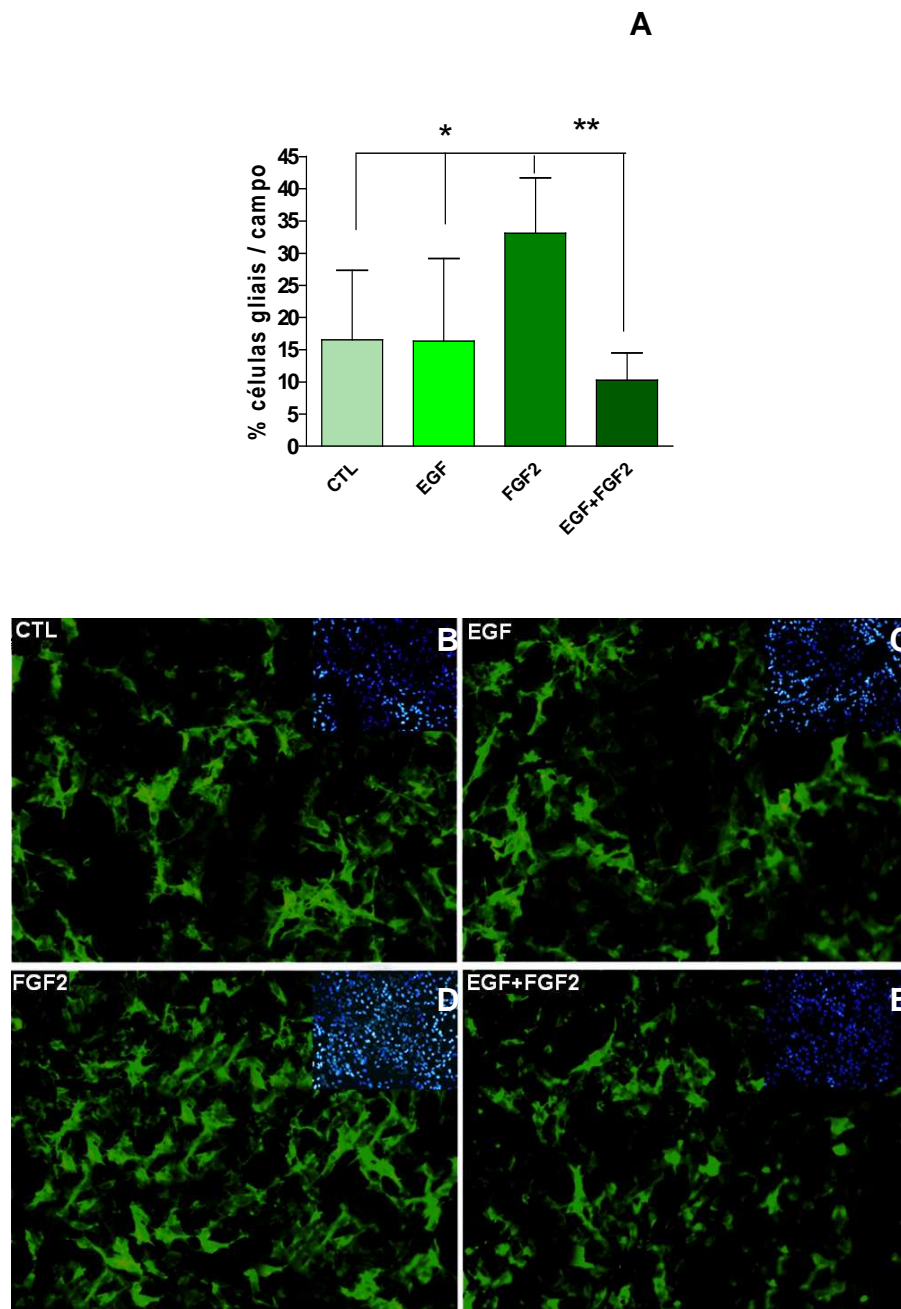


Figura 9. Análise do fenótipo glial sob a influência de EGF e/ou FGF2 nas células da CNT na fase de migração. (A) Gráfico da análise da porcentagem de células gliais a partir de culturas controle e tratadas com FGF2 (20ng/mL) e EGF (10ng/mL) apenas nas primeiras 24h de cultura primária. Resultado expresso como proporção de células gliais, contando-se 60 campos aleatórios em 10 experimentos independentes. Os resultados representam a proporção da média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ por ANOVA. (B-E) Imunofluorescência indireta utilizando-se anticorpo anti-SMP para identificação das células gliais (verde) e DAPI (azul) para marcação dos núcleos totais (Aumento: 200x).

4.1.4. FGF2 e EGF não estimulam a diferenciação de células musculares lisas a partir das células da CNT.

Tanto o tratamento com EGF, quanto o tratamento com FGF2, e o tratamento concomitante com os dois fatores de crescimento, não alteraram a proporção de células musculares lisas em relação à condição controle (Fig. 10).

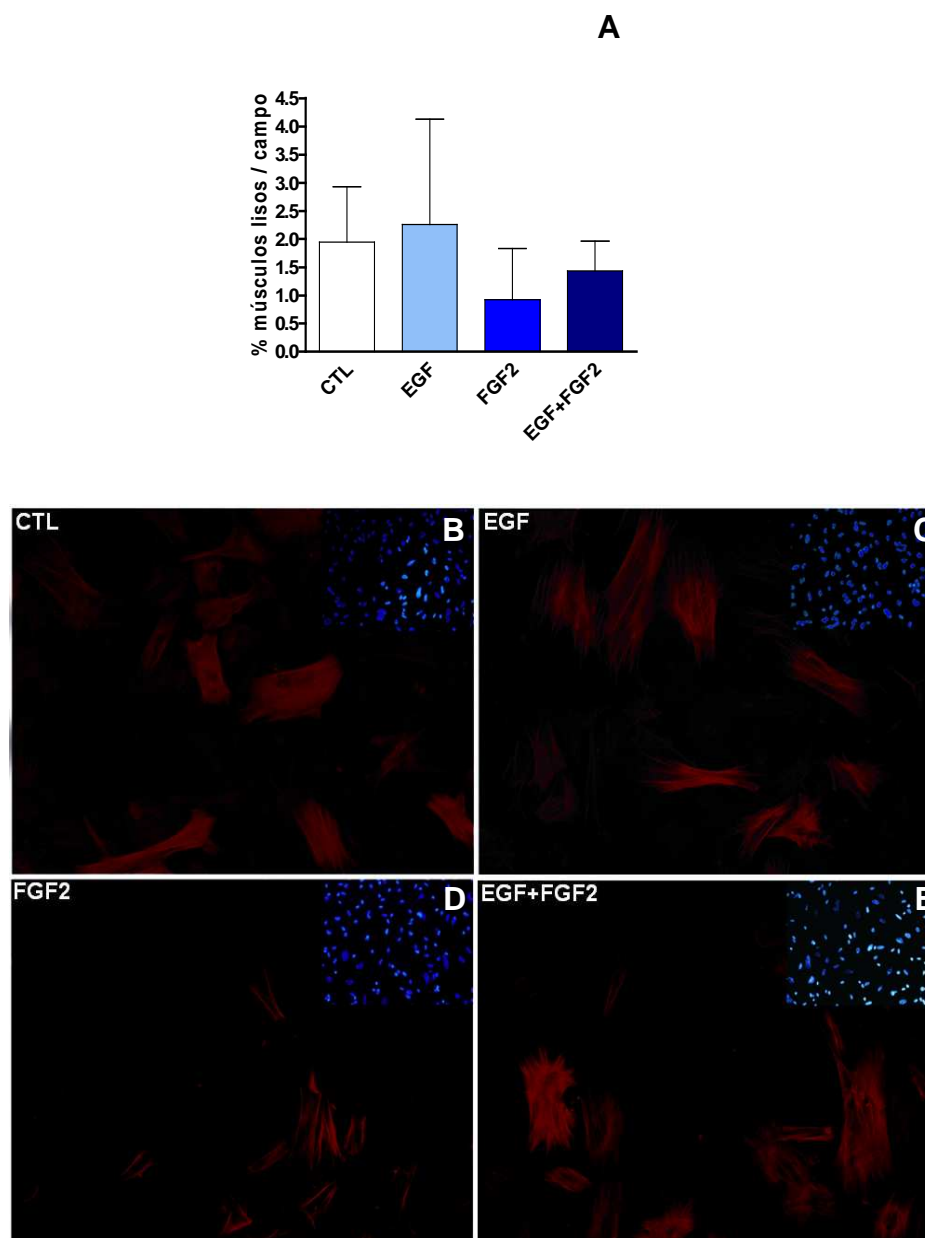


Figura 10. Análise do fenótipo músculo liso sob a influência de EGF e/ou FGF2 nas células da CNT na fase de migração. (A) Gráfico da análise da porcentagem de células musculares lisas a partir de culturas controle e tratadas com FGF2 (20ng/mL) e EGF (10ng/mL) apenas nas primeiras 24h de cultura primária. Resultado expresso como proporção de células musculares lisas, contando-se 60 campos aleatórios em 10 experimentos independentes. Os resultados representam a proporção da média \pm desvio padrão. (B-E) Imunofluorescência indireta utilizando-se anticorpos anti-SMA para identificação das células musculares lisas (vermelho) e DAPI (azul) para marcação dos núcleos totais (Aumento: 200x).

5. DISCUSSÃO

Durante o processo de migração, as células da CN são expostas a uma série de fatores presentes no microambiente embrionário que participam ativamente do seu processo de diferenciação. Baroffio e colaboradores (1991) observaram que o tubo neural da região truncal de aves, quando devidamente dissecado e colocado em condições adequadas de cultura, permite a migração das células da CN das bordas dorsais do tubo neural para a superfície do recipiente de cultura. Dessa maneira, utilizando uma condição de cultura adequada, as células da CNT podem se diferenciar nos diversos fenótipos celulares *in vitro* (Trentin, et al, 2004). Baseando-se nessa metodologia de cultura das células da CNT observamos que os fatores de crescimento FGF2 e EGF só são capazes de influenciar a diferenciação dos derivados truncais da CN *in vitro* quando oferecidos às células da CNT nas primeiras 24 horas de cultura, durante ainda a fase de migração destas células. Tanto o tratamento com EGF quanto com FGF2, nas primeiras 24h de cultura secundária após 15h de migração, não produziram efeitos significativos na especificação para os diversos fenótipos obtidos a partir da CNT. Tais resultados indicam que as primeiras 15h de cultura são cruciais para determinação e/ou especificação dos progenitores multipotentes da CN sugerindo que esses fatores estejam atuando nos progenitores mais indiferenciados e multipotentes.

Os resultados obtidos após o tratamento das células da CNT de codorna com FGF2, durante a fase de migração, mostram que este fator tem um importante papel no processo de diferenciação para o fenótipo glial, promovendo um aumento significativo no número de células gliais (Fig. 11). Esses dados corroboram dados da literatura sobre a indução gliogênica do FGF2 em mamíferos na região cefálica e truncal da CN (Ota e Ito, 2006; Ijuin *et al.*, 2008). No entanto, ainda há pontos controversos com relação ao exato papel que o FGF2 exerce na diferenciação das células da CN. Segundo Ijuin e colaboradores (2008), o FGF2 atua diretamente na diferenciação de células já restritas com o potencial gliogênico. Já Bittencourt (2007), através de experimentos com CNT de codorna, tratando as células com FGF2 por todo o período de cultura secundária (aproximadamente 6 dias), sugere um papel desse fator na diminuição de células diferenciadas, e no aumento de progenitores mais indiferenciados, através da sua proliferação e renovação.

O EGF, assim como o FGF2, atua em diversos processos durante o desenvolvimento embrionário, porém, são raros os dados na literatura sobre a influência do mesmo sobre as células da CN. Sabe-se que esse fator de crescimento exerce um papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), como por exemplo, promovendo a proliferação e migração de células progenitoras no SNC de adultos (Wong e Guillaud, 2004), além de sua participação na formação de tumores, promovendo a proliferação destas células (Ho et al., 2005). De maneira semelhante à CN, que é formada por uma população de células heterogênea com potencialidades diversas, muitos tumores são formados por células altamente indiferenciadas e com um alto potencial proliferativo, além de células tumorais mais diferenciadas e com baixo potencial proliferativo (Pardal et al., 2003). O EGF, por estar envolvido com a manutenção dos tumores, pode influenciar na proliferação, e conseqüente auto-renovação, das células tumorais mais indiferenciadas. Já a partir de nossos experimentos em modelo de CNT *in vitro*, observamos que o principal efeito desse fator de crescimento está diretamente relacionado com a diferenciação celular, e mais especificamente neurogênica e melanogênica. Nossos resultados mostram um aumento significativo tanto no número de neurônios, quanto no número de melanócitos após o tratamento com EGF, mostrando um efeito expressivo desse fator sobre as células da CNT em migração.

Surpreendentemente, quando tratamos as células com FGF2 e EGF concomitantemente, não observamos o mesmo padrão de indução do FGF2 para o fenótipo glial, nem o de indução do EGF para o fenótipo melanocítico. Estudos realizados no SNC relacionando FGF2 e EGF mostram uma regulação temporal positiva de FGF2 sobre EGF, promovendo um aumento da expressão de receptores de EGF em células precursoras neurais durante o desenvolvimento embrionário (Lillien e Raphael, 2000). Na CNT ainda não se sabe ao certo qual a relação entre esses dois fatores de crescimento, porém, nossos resultados indicam que o EGF possivelmente atua como um antagonista do efeito pró-gliogênico do FGF2, e o FGF2 atua como um antagonista do efeito pró-melanogênico do EGF. Um fato interessante encontrado é que o EGF, mesmo em presença de FGF2, é ainda capaz de determinar a diferenciação neurogênica nas mesmas proporções. Nesse caso a ação do EGF não é bloqueada pelo FGF2, como no caso do fenótipo melanocítico (Fig. 11) sugerindo um mecanismo regulatório distinto do EGF sobre a diferenciação de neurônios derivados da CN.

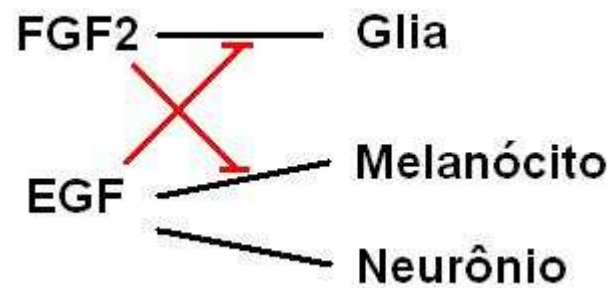


Figura 11. Esquema de ação dos fatores FGF2 e EGF sobre a diferenciação das células da CNT de codornas, *in vitro*. O FGF2 favorece a diferenciação glial. Já o EGF favorece a diferenciação para melanócito e neurônios. As linhas vermelhas indicam um efeito antagonista do FGF2 sobre o efeito pró-melanogênico do EGF e, por sua vez, o efeito antagonista do EGF sobre o efeito pró-gliogênico do FGF2.

Considerando que a população da CN que migra a partir do tubo neural é uma população heterogênea, com progenitores de diversas potencialidades (Trentin *et al.*, 2004; Calloni *et al.*, 2009), nossos dados sugerem que esses fatores podem estar atuando de maneira competitiva num progenitor misto, possivelmente glia-melanócito. E o EGF possivelmente atua também em um progenitor não responsivo ao FGF2, envolvido com diferenciação neurogênica (Fig. 12). Porém, para reais afirmações a respeito da influência desses fatores sobre os progenitores da CN são necessários demais experimentos, como clonagens de células.

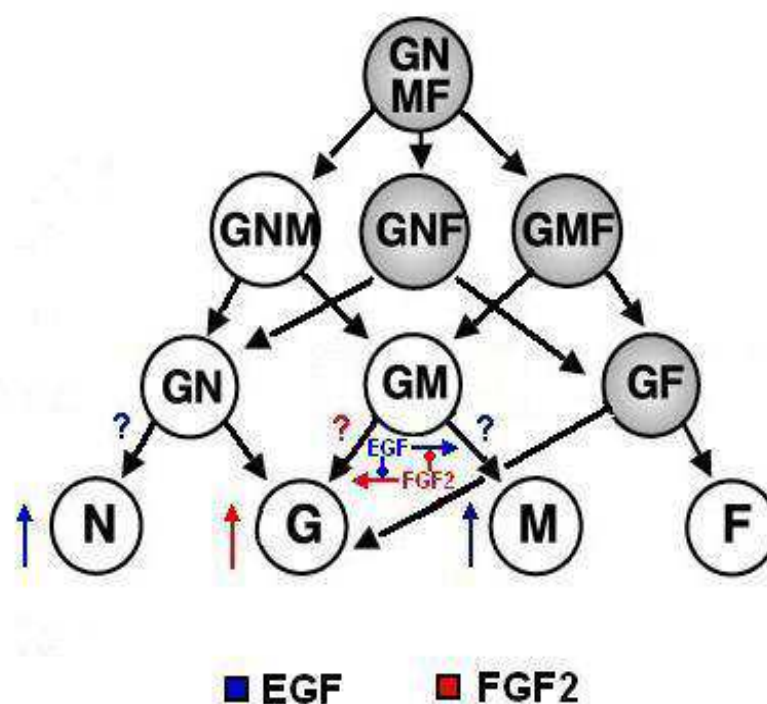


Figura 12. Modelo de linhagens celulares na CNT. Progenitores são classificados de acordo com o número de potenciais de desenvolvimento. Células multipotentes da CN de codornas passam por restrições progressivas de desenvolvimento produzindo precursores intermediários oligopotentes e progenitores já comprometidos com uma linhagem celular, que se diferenciam em neurônios (N), células gliais (G), melanócitos (M) e músculo liso (F). Aqui nós demonstramos os efeitos do EGF (setas azuis) e FGF2 (seta vermelha) sobre a diferenciação das células mais restritas da crista neural truncal, e possível ação destes fatores (pontos de interrogação) sobre progenitores mais indiferenciados. Seta: Efeito estimulatório; Bola: Efeito inibitório. Adaptado Trentin *et al.* (2004).

Resultados como os deste trabalho, demonstrando as influências do FGF2 e do EGF sobre a diferenciação das células da CN, certamente contribuirão para uma maior compreensão da biologia das células da CN, o que se torna extremamente importante para avanços nos estudos de Biologia do Desenvolvimento. Conhecendo a biologia dessas células pode-se também partir para aplicações terapêuticas, a partir da utilização de células derivadas da CN, para o tratamento de diversas patologias. Isso seria de extrema importância para a Medicina, já que essas terapias seriam baseadas na utilização de fontes acessíveis e autólogas de células, não havendo assim problemas éticos em sua utilização.

6. CONCLUSÕES

- Com o tratamento na fase de migração das células da CNT, os fatores de crescimento EGF e FGF2 mostraram-se capazes de modular a diferenciação dessas células. O EGF favorecendo a diferenciação para neurônio e melanócito, enquanto o FGF2 favorecendo a diferenciação para células gliais.

- Os tratamentos com EGF e/ou FGF2 nas primeiras 24h da fase de diferenciação não alteraram de maneira significativa a proporção de diferenciação para nenhum dos fenótipos analisados, indicando que as primeiras 15h de cultura (fase de migração) são cruciais para determinação e/ou especificação dos progenitores multipotentes da CN.

- A ação combinada de EGF e FGF2 mostrou um possível efeito antagonista do FGF2 sobre o efeito pró-melanogênico do EGF, e também um efeito antagonista do EGF sobre o efeito pró-gliogênico do FGF2. Já o efeito pró-neurogênico do EGF não foi afetado pela presença de FGF2. Mostrando que esses fatores podem estar atuando de maneira competitiva num progenitor misto, possivelmente glia-melanócito, e que o EGF possivelmente atua também em um progenitor não responsivo ao FGF2, envolvido com diferenciação neurogênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2006). **Biologia Molecular da Célula** (4ª edição) São Paulo: Editora Artmed, 1090-117.
- BAROFFIO, A.; DUPIN, E.; LE DOUARIN, N.M. (1991). **Common precursors for neural and mesectodermal derivatives in the cephalic neural crest.** *Development*. 112: 301-305.
- BERNFELD, M.; HOOPER, K. C. (1991). **Possible regulation of FGF activity by syndecan, an integral membrane heparan sulfate proteoglycan.** *Ann N Y Acad Sci*. 638: 182-94.
- BITTENCOURT, D. A. **Efeito do FGF2 na diferenciação de células da crista neural truncal (CNT) de codornas *in vitro*.** 2007. 64 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- BRITO, J. M., TEILLET, M. A., LE DOUARIN, N. M. (2006). **An early role for sonic hedgehog from foregut endoderm in jaw development: ensuring neural crest cell survival.** *Proc. Natl. Acad. Sci*. 103(31): 11607-12.
- BRONNER-FRASER, M & FRASER, S. E. (1988). **Cell lineage analyses reveals multipotency of some avian neural crest cells.** *Nature*. 335: 161-164.
- CALLONI, G. W., C. GLAVIEUX-PARDANAUD, N. M. LE DOUARIN AND E. DUPIN. (2007). **Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 104: 19879-19884.
- CALLONI, G. W., LE DOUARIN, N.M.; DUPIN, E. (2009). **High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic, and osteogenic differentiation capacities.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(22):8947-8952.
- CHIOU, M.; XU, Y.; LONGAKER, M.T. (2006). **Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 343: 644-52.
- COHEN, A. M.; KONIGSBERG, I. R. (1975). **A clonal approach to the problem of neural crest determination.** *Dev Biol*. 46(2): 262-80.
- COSTA-SILVA, B.; DA COSTA, M. C.; MELO, F. R.; NEVES, C. M.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G. (2009). **Fibronectin promotes differentiation of neural crest progenitors endowed with smooth muscle cell potential.** *Exp Cell Res*. 315(6):955-67.

- CRANE, J. F.; TRAINOR, P. A. (2006). **Neural crest stem and progenitor cells.** *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22: 267-86.
- DAILEY, L.; AMBROSETTI, D.; MANSUKHANI, A.; BASILICO, C. (2005). **Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling.** *Cytokine Growth Factor Reviews.* 16: 233-247.
- DORSKY, R. I.; MOON, R. T.; RAIBLE, D. W. (1998). **Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway.** *Nature.* 396 (6709): 370-3.
- DULAC, C.; TROPAK, M. B.; CAMERON-CURRY, P.; ROSSIER, J.; MARSHAK, D. R.; RODER, J.; LE DOUARIN, N. M. (1992) **Molecular characterization of the Schwann cell myelin protein, SMP: structural similarities within the immunoglobulin superfamily.** *Neuron.* 8(2): 323-34.
- DUPIN, E.; BAROFFIO, A.; DULAC, C.; CAMERON-CURRY, P. (1990). **Schwann-cell differentiation in clonal cultures of the neural crest, as evidenced by the anti-schwann cell myelin protein monoclonal antibody.** *Neurobiology.* 87: 1119-23.
- ERICKSON, C. A.; TURLEY, E. A. (1987). **The effects of epidermal growth factor on neural crest cells in tissue culture.** *Exp cell Res.* 169:267-279.
- FORANDER, P.; BROBERGER, C.; STROMBERG, I. (2001). **Glial-cell-line-derived neurotrophic factor induces nerve fibre formation in primary cultures of adrenal chromaffin cells.** *Cell Tissue Res.* 305: 43-51.
- GILBERT, S.F. **Developmental Biology** (6 ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2000.
- GOLDING, J. P.; TRAINOR, P.; KRUMLAUF, R.; GASSMANN, M. (2000) **Defects in pathfinding by cranial neural crest cells in mice lacking the neuregulin receptor ErbB4.** *Nature Cell Biology.* 2(2): 103-109.
- HO, R.; MINTURN, J. E.; HISHIKI, T.; ZHAO, H.; WANG, O.; CNAAN, A.; MARIS, J.; EVANS, A. E.; BRODEUR, G. M. (2005). **Proliferation of human neuroblastomas mediated by the Epidermal Growth Factor Receptor.** *Cancer Research.* 65 (21): 9868-9875.
- IJUIN, K., K. NAKANISHI AND K. ITO. (2008). **Different downstream pathways for Notch signaling are required for gliogenic and chondrogenic specification of mouse mesencephalic neural crest cells.** *Mech. Dev.* 125: 462-474.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 339p

KILPATRICK, T. J.; BARTLETT, P. F. (1995). **Cloned multipotential precursors from the mouse cerebrum require FGF-2, whereas glial restricted precursors are stimulated with either FGF-2 or EGF.** *The Journal of Neuroscience*. 15(5): 3653-3661.

LE DOUARIN, N.M.; KALCHEIM, C. **The Neural Crest.** 2 Ed. New York: Cambridge Univ. Press, 1999.

LE DOUARIN, N.M. (2008). **Developmental patterning deciphered in avian chimeras.** *Dev Growth Differ*. 50: 11-28.

LE DOUARIN, N.M.; CALLONI, G. W.; DUPIN, E. (2008) **The stem cells of the neural crest.** *Cell Cycle*. 7 (8): 1013-9.

LI, F.; LUO, Z.; HUANG, W.; LU, Q.; WILCOX, C. S.; JOSE, P. A.; CHEN, S. (2007). **Response gene to complement 32, a novel regulator for transforming growth factor-beta-induced smooth muscle differentiation of neural crest cells.** *J Biol Chem*. 282(14): 10133-7.

LILLIEN, L.; RAPHAEL, H. (2000). **BMP and FGF regulate the development of EGF-responsive neural progenitor cells.** *Development*. 127(22): 4993-5005.

OTA, M., ITO, K. (2006). **BMP and FGF-2 regulate neurogenin-2 expression and the differentiation of sensory neurons and glia.** *Dev. Dyn*. 235: 646–655.

PARDAL, R.; CLARKE, M. F., MORRISON, S. J. (2003). **Applying the principles of stem-cell biology to cancer.** *Nat. Rev. Cancer*. 3(12): 895-902.

REISSMANN, E.; ERNSBERGER, U.; FRANCIS-WEST, P. H.; RUEGER, D.; BRICKELL, P. M.; ROHRER, H. (1996). **Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons.** *Development*. 122(7): 2079-88.

SCHNEIDER, C.; WICHT, H.; ENDERICH, J.; WEGNER, M.; ROHRER, H. (1999). **Bone morphogenetic proteins are required in vivo for the generation of sympathetic neurons.** *Neuron*. 24(4): 861-70.

SHAH, N. M.; MARCHIONNI, M.A.; ISAACS, I.; STROOBANT, P.; ANDERSON, D. J. (1994). **Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate.** *Cell*. 77: 349-60.

SNIDER, P.; OLAOPA, M.; FIRULLI, A. B.; CONWAY, S. J. (2007). **Cardiovascular development and the colonizing cardiac neural crest lineage.** *Scientific World Journal*. 7: 1090-113.

TANEYHILL, L. A.; BRONNER-FRASER, M. (2006). **Recycling signals in the neural crest.** *Journal of Biology*. 4(10): 1-5.

TANEYHILL, L. A. (2008). **To adhere or not to adhere: the role of Cadherins in neural crest development.** *Cell Adh Migr.* 2(4): 223-30.

TRAINOR, P. A. (2005). **Specification of neural crest cell formation and migration in mouse embryos.** *Semin Cell Dev Biol.* 16(6): 683-93.

TRENTIN, A.G.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C.; LE DOUARIN, N.; DUPIN, E. (2004). **Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 10: 4495-500.

WONG, R.W.; GUILLAUD, L. (2004). **The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS.** *Cytokine Growth Factor Rev.* 15(2): 147-56.

ANEXO

“Epidermal Growth Factor (EGF) Promotes the In Vitro Differentiation of Neural Crest Cells to Neurons and Melanocytes.” Artigo publicado.

Epidermal Growth Factor (EGF) Promotes the In Vitro Differentiation of Neural Crest Cells to Neurons and Melanocytes

Ricardo Castilho Garcez · Bianca Luise Teixeira ·
Suelen dos Santos Schmitt · Márcio Alvarez-Silva ·
Andréa Gonçalves Trentin

Received: 6 March 2009 / Accepted: 13 April 2009
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract Proliferation of neural crest (NC) stem cells and their subsequent differentiation into different neural cell types are key early events in the development of the peripheral nervous system. Soluble growth factors present at the sites where NC cells migrate are critical to the development of NC derivatives in each part of the body. In the present study, we further investigate the effect of microenvironmental factors on quail trunk NC development. We show for the first time that EGF induces differentiation of NC to the neuronal and melanocytic phenotypes, while fibroblast growth factor 2 (FGF2) promotes NC differentiation to Schwann cells. In the presence of both EGF and FGF2, the neuronal differentiation predominates. Our results suggest that FGF2 stimulates gliogenesis, while EGF promotes melanogenesis and neurogenesis. The combination of both growth factors stimulates neurogenesis. These findings suggest that these two growth factors may play an important role in the fate

decision of NC progenitors and in the development of the peripheral nervous system.

Keywords Neural crest · Glia · Neuron · Melanocyte · EGF · Stem cells · FGF2 · Peripheral nervous system

Introduction

The neural crest (NC) is formed by the lateral borders of the neural primordium during neurulation. After extensive migration through embryonic tissues, NC cells differentiate into a large variety of cell types, including neurons and glial cells of the peripheral nervous system, melanocytes, and some endocrine cells. Cephalic NC cells yield adipocytes, chondrocytes, osteocytes, forebrain meninges, connective tissue cells in gland and muscles, the cardiac outflow tract and the vascular smooth muscle cells associated with the vessels derived from the aortic arches and those that supply blood to the face and forebrain (Le Douarin and Kalcheim 1999; Le Douarin et al. 2008). The existence of a high number of multipotent NC progenitors endowed with both chondrogenic and neural potentials has been recently described (Calloni et al. 2007). In addition, both avian and mammalian NC cells are able to self-renew in vitro, demonstrating that subsets of NC cells display true stem cell properties (Stemple and Anderson 1992; Trentin et al. 2004).

Soluble growth factors play a role in NC development. Among these growth factors, fibroblast growth factor 2 (FGF2) has been demonstrated to promote the survival and proliferation of NC cells (Kalcheim 1989; Murphy et al. 1994) and to regulate their migration (Kubota and Ito 2000). In addition, FGF2 has been reported to promote chondrogenesis, skeletogenesis, and gliogenesis in neural

R. C. Garcez · B. L. Teixeira · S. dos Santos Schmitt ·
M. Alvarez-Silva · A. G. Trentin (✉)
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética,
Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa
Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis,
SC 88040-900, Brazil
e-mail: atrentin@ccb.ufsc.br

R. C. Garcez · M. Alvarez-Silva · A. G. Trentin
Programa de Pós-graduação em Neurociências, Centro de
Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina,
Campus Universitário, Trindade, Florianópolis,
SC 88040-900, Brazil

M. Alvarez-Silva · A. G. Trentin
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas, Universidade
Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade,
Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

crest of both quail and mouse embryos, and at cephalic and trunk levels (Sarkar et al. 2001; Petiot et al. 2002; Ido and Ito 2006; Ota and Ito 2006; Ijuin et al. 2008). Epidermal growth factor (EGF) has also been suggested to play a role in quail NC production of proteoglycans and proliferation in vitro (Erickson and Turley 1987). However, the role of EGF in NC differentiation has never been investigated. In this paper, for the first time, we show that EGF promotes the differentiation of quail trunk NC cells to the neuronal and melanocytic phenotypes. In addition, we further demonstrate the effects of FGF2 in stimulating NC differentiation to Schwann cells.

Methods

Neural tubes obtained from quail embryos (18–25 somite stage) were dissected at the trunk level and plated in uncoated plastic culture dishes (Corning) in the basal medium α -minimum essential medium (α -MEM; Gibco-BRL), enriched with 10% fetal bovine serum (FCS, Cult-lab) and 2% chicken embryonic extract (EE). After 24 h, emigrated NC cells were harvested for secondary plating in mass cultures (400 cells per well of a 96-well plate). Plastic dishes for secondary culture were coated with type I collagen (Sigma). Cultures were maintained for an additional 6 days in a complex medium containing basal medium enriched with growth factors and hormones (Trentin et al. 2004). The treatment with human recombinant FGF-2 (20 ng/ml, Sigma) and/or mouse submaxillary gland EGF (10 ng/ml, Sigma) was added during the primary culture (first 24 h of culture).

Cell phenotypes were analyzed using lineage-specific markers. Mature melanocytes were identified by the presence of melanin, smooth muscle cells by immunoreactivity to mouse α -smooth muscle actin (α SMA) mAb (Sigma), glial cells by staining with Schwann cell myelin protein (SMP) mAb (Dulac et al. 1988), and neurons by staining with tyrosine hydroxylase (TH) mAb (Fauquet and Ziller 1989), β III-Tubulin (β III-Tub) mAb (Promega). Detailed procedures are described elsewhere (Dupin et al. 2000; Trentin et al. 2004). Cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Sigma). Fluorescent labeling was observed under an epifluorescence microscope (Olympus IX71). Pigmented cells were quantified in macroscopic views by evaluation of the intensity of melanin expression as arbitrary densitometric units (Scion, Image, National Institutes of Health) (Fig. 1). Quantification of phenotypic markers was performed at day 6 of culture by direct cell counting of positive cells in relation to total cell population (Fig. 2).

Statistical differences were evaluated by means of one-way ANOVA with Turkey's post test using the GraphPad

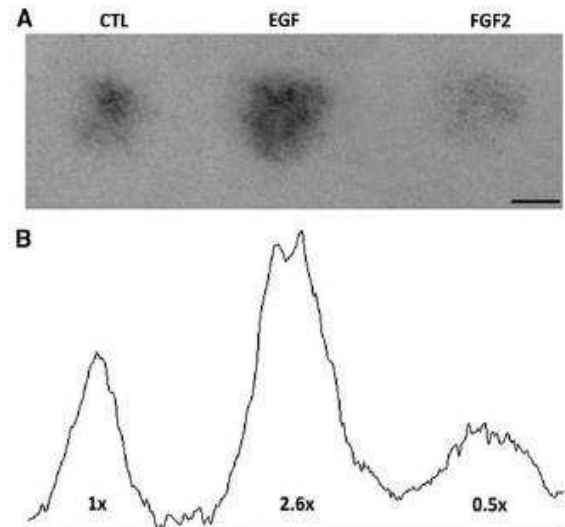


Fig. 1 Macroscopic views (a) and quantification (b) of the pigmented cells (melanocytes) in 6-day NC secondary cultures. Cultures were maintained in basic medium (CTL, control) or treated with FGF2 or EGF during the 24 h of primary culture, and then in the complex medium during the 6 days of secondary culture as described in "Methods". Pigmented cells were quantified in macroscopic views by evaluation of the intensity of melanin expression as arbitrary densitometric units. Bar = 5 mm

Prism software (GraphPad Software, Inc.). The level of significance was set at $P < 0.05$ in all cases.

Results

Macroscopic views of NC cultures revealed that EGF treatment increased the number of pigmented cells (melanocytes) by 2.6-fold relative to the control. In contrast, the number of melanocytes was reduced by twofold after FGF2 treatment (Fig. 1). Figure 2 shows representative pictures of melanocytes (melanin-expressing cells), smooth muscle cells (α SMA⁺ cells), Schwann cells (SMP⁺ cells), and neurons (β III tub/TH⁺ cells), maintained in control conditions, or treated with EGF, FGF2 or a combination of both (EGF + FGF2). Confirming the results from the macroscopic views, quantitative analysis of cells positive for these phenotypic markers revealed that melanocytes represented 13% of EGF-treated cells, about 2.8-fold more than the percentage obtained in control conditions, after treatment with FGF2 or EGF + FGF2 (Fig. 3a). In contrast, the proportion of smooth muscle cells was similar in all culture conditions (about 2% of the total cell population) (Fig. 3b). The highest proportion of Schwann cells was observed in FGF2-treated cultures (33%), an increase of approximately twofold when compared with all other

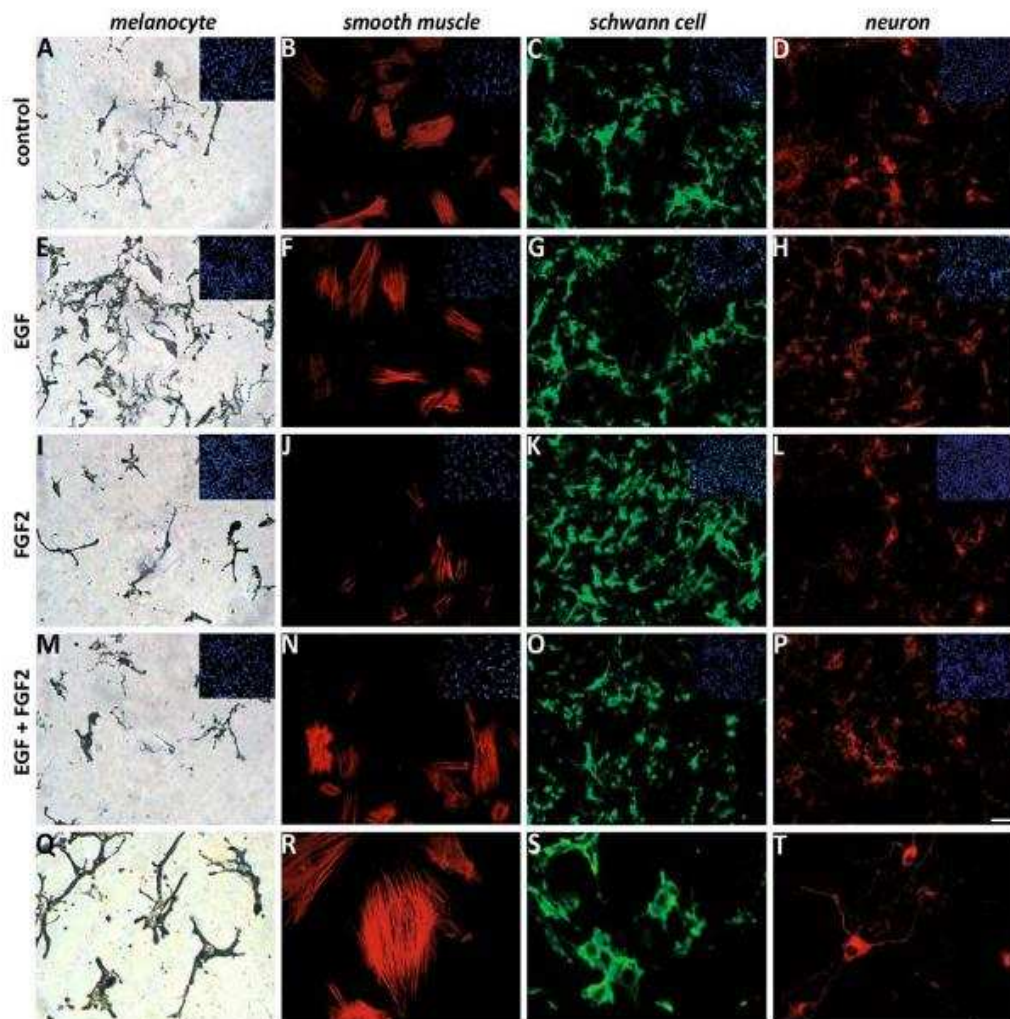


Fig. 2 Phenotypic analysis of cultured NC cells at day 6 of secondary culture. NC cells were grown and treated in primary cultures as described in Fig. 1 and in “Methods”. Control cells (a–d), EGF (e–h), FGF2 (i–l), and EGF + FGF2 (m–p). Cell phenotypes were identified by the presence of specific cell markers: melanin for

melanocytes (a, e, i, m, q), α SMA for smooth muscle cells (b, f, j, n, r), SMP for Schwann cells (c, g, k, o, s), and β -III-Tub and TH for neurons (d, h, l, p, t). Higher magnification pictures of melanocytes, smooth muscle cells, glial cells and neurons (q, r, s, t, respectively). Inserts represent the nuclei staining with DAPI. Scale bar = 50 μ m

culture conditions (Fig. 3c). Neurons comprised about 3.1–3.4% of the total cell population after the EGF and EGF + FGF2 treatments, about 3.8-fold and 4-fold, respectively, more than in the control and FGF2-treated cultures (Fig. 3d). In our culture conditions, every neuron was positive for β III-tub, and some of them also expressed TH. Neurons were observed for at least 10 days in culture. Our experiments also revealed that EGF treatment during the first 24 h of primary culture was critical for the observed increase in the percentage of neurons and pigmented cells, while treatment during the secondary culture period (24 h to 6 days) did not affect the proportion of these cell types relative to control (data not shown).

Discussion

In the present work, we provide the first evidence that EGF is an important soluble factor involved in the development of the peripheral nervous system. We show, for the first time, that this growth factor promotes the neuronal differentiation of embryonic NC cells, and also stimulates melanogenesis. In contrast, FGF2 stimulates gliogenesis by NC cells.

Soluble growth factors present at the sites where NC cells migrate are critical to the development of NC derivatives in each part of the body. Such growth factors include bone morphogenetic protein (BMP) 2/4, which drive NC cells to adopt autonomic sympathetic-like neuronal fate

- neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19879–19884
- Dulac C, Cameron-Curry P, Ziller C, Le Douarin NM (1988) A surface protein expressed by avian myelinating and nonmyelinating Schwann cells but not by satellite or enteric glial cells. *Neuron* 1:211–220
- Dupin E, Glavieux C, Vaigot P, Le Douarin NM (2000) Endothelin 3 induces the reversion of melanocytes to glia through a neural crest-derived glial-melanocytic progenitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7882–7887
- Erickson CA, Turley EA (1987) The effects of epidermal growth factor on neural crest cells in tissue culture. *Exp Cell Res* 169:267–279
- Fauquet M, Ziller C (1989) A monoclonal antibody directed against quail tyrosine hydroxylase: description and use in immunocytochemical studies on differentiating neural crest cells. *J Histochem Cytochem* 37:1197–1205
- Fogarty MP, Emmenegger BA, Grasfeder LL, Oliver TG, Wechsler-Reya RJ (2007) Fibroblast growth factor blocks Sonic hedgehog signaling in neuronal precursors and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:2973–2978
- Ido A, Ito K (2006) Expression of chondrogenic potential of mouse trunk neural crest cells by FGF2 treatment. *Dev Dyn* 235:361–367
- Ijuin K, Nakanishi K, Ito K (2008) Different downstream pathways for Notch signaling are required for gliogenic and chondrogenic specification of mouse mesencephalic neural crest cells. *Mech Dev* 125:462–474
- Kalcheim C (1989) Basic fibroblast growth factor stimulates survival of nonneuronal cells developing from trunk neural crest. *Dev Biol* 134:1–10
- Kubota Y, Ito K (2000) Chemotactic migration of mesencephalic neural crest cells in the mouse. *Dev Dyn* 217:170–179
- Lahav R, Ziller C, Dupin E, Le Douarin NM (1996) Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3892–3897
- Lahav R, Dupin E, Lecoin L, Glavieux C, Champeval D, Ziller C, Le Douarin NM (1998) Endothelin 3 selectively promotes survival and proliferation of neural crest-derived glial and melanocytic precursors in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14214–14219
- Le Douarin NM, Kalcheim C (1999) *The neural crest*. Cambridge University Press, Cambridge
- Le Douarin NM, Calloni GW, Dupin E (2008) The stem cells of the neural crest. *Cell Cycle* 7:1013–1019
- Morrison SJ, Perez SE, Qiao Z, Verdi JM, Hicks C, Weinmaster G, Anderson DJ (2000) Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* 101:499–510
- Murphy M, Reid K, Ford M, Furness JB, Bartlett PF (1994) FGF2 regulates proliferation of neural crest cells, with subsequent neuronal differentiation regulated by LIF or related factors. *Development (Cambridge, England)* 120:3519–3528
- Nakanishi K, Chan YS, Ito K (2007) Notch signaling is required for the chondrogenic specification of mouse mesencephalic neural crest cells. *Mech Dev* 124:190–203
- Ota M, Ito K (2006) BMP and FGF-2 regulate neurogenin-2 expression and the differentiation of sensory neurons and glia. *Dev Dyn* 235:646–655
- Petiot A, Ferretti P, Copp AJ, Chan CT (2002) Induction of chondrogenesis in neural crest cells by mutant fibroblast growth factor receptors. *Dev Dyn* 224:210–221
- Sarkar S, Petiot A, Copp A, Ferretti P, Thorogood P (2001) FGF2 promotes skeletogenic differentiation of cranial neural crest cells. *Development (Cambridge, England)* 128:2143–2152
- Shah NM, Anderson DJ (1997) Integration of multiple instructive cues by neural crest stem cells reveals cell-intrinsic biases in relative growth factor responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11369–11374
- Shah NM, Groves AK, Anderson DJ (1996) Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell* 85:331–343
- Stemple DL, Anderson DJ (1992) Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* 71:973–985
- Thomas S, Thomas M, Wincker P, Babarit C, Xu P, Speer MC, Munnich A, Lyonnet S, Vekemans M, Etchevers HC (2008) Human neural crest cells display molecular and phenotypic hallmarks of stem cells. *Hum Mol Genet* 17:3411–3425
- Trentin A, Glavieux-Pardanaud C, Le Douarin NM, Dupin E (2004) Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4495–4500